

Особенности воспалительной реакции при коллагенозах

Трофименко Н.А., Зорина В.Н., Архипова С.В., Горбатовский Я.А., Зорина Р.М.

Peculiarities of inflammatory response during collagenosis

Trofimenko N.A., Zorina V.N., Arkhipova S.V., Gorbatovsky Ya.A., Zorina R.M.

Центральная научно-исследовательская лаборатория,
Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей Минздрава РФ, г. Новокузнецк

© Трофименко Н.А., Зорина В.Н., Архипова С.В. и др.

Исследованы концентрации цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α) α 2-макроглобулина (МГ), плазминогена (ПЛ) α 1-антитрипсина (АТ), общего белка, альбумина и мочевой кислоты в сыворотке крови пациентов с коллагенозами с целью изучения их комплексного взаимодействия и возможности их использования при дифференциальной диагностике. Исследована сыворотка крови 60 здоровых доноров, 53 пациентов с ревматоидным артритом (РА), 15 пациентов с реактивным артритом (РЕА) и 16 больных с системной красной волчанкой (СКВ). Концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α определялись ELISA, МГ, АТ и ПЛ-ракетным иммуноэлектрофорезом, общий белок, альбумин и мочевая кислота — биохимическими методами. Уровень альбумина снижался у всех групп пациентов. Концентрация общего белка снижалась только при 1-й степени активности РА. Уровни МГ, АТ и ПЛ не различались при всех заболеваниях по сравнению с контролем. Концентрация ИЛ-6 значительно увеличивалась у всех групп больных. ФНО- α рос при утяжелении РА, но только при самой тяжелой степени статистически значимо отличался от РЕА и СКВ. Схожие тенденции демонстрировала концентрация ИЛ-1 β в случае с РА и СКВ, но при РЕА выявлены большие индивидуальные колебания с высоким средним уровнем.

Синхронное изменение концентраций изучаемых цитокинов без сопутствующего изменения уровня МГ свидетельствуют о повреждении транспортных и регуляторных функций данного белка. Мочевая кислота может быть использована для диагностики СКВ, динамическое наблюдение за концентрациями ИЛ-1 β и ФНО- α может служить прогностическим критерием при РА.

Ключевые слова: коллагенозы, ревматоидный артрит, реактивный артрит, СКВ, цитокин, белки острой фазы, воспаление.

Concentrations of cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) of α 2-macroglobulin (MG), α 1-antitrypsin (AT) plasminogen (PL), whole protein, albumin and uric acid in blood serum of patients with collagenosis have been investigated aiming the study of their complex interaction and the possibility of their use during differential diagnostics. The blood serum of 60 healthy donors, 53 patients with rheumatoid arthritis (RA), 15 patients with reactive arthritis (REA) and 16 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) has been studied. IL-1 β , IL-6 and TNF- α concentrations have been defined by ELISA, MG, AT and PL-rocket immunoelectrophoresis, the whole protein, albumin and uric acid — by biochemical methods. The albumin level decreased in all groups of patients. The whole protein concentration decreased at the first RA activity degree. MG, AT and PL levels had no difference at all diseases as compared to the control group. IL-6 concentration increased significantly at all patients groups. TNF- α increased with the RA severity but differed statistically significantly from REA and SLE only at the most severe degree. Analogous trends in IL-1 β concentration have been found in cases of RA and SLE but at REA great individual fluctuations with the high average level have been found. Synchronous change of the studied cytokine concentrations without associated MG level change is evidence of the damage of traffic and regulatory functions of this protein. The uric acid can be used for SLE diagnostics and the dynamic supervision of IL-1 β and TNF- α can be a prognostic criterion at RA.

Введение

Коллагенозы относятся к аутоиммунным заболеваниям, особенностью которых является хронический воспалительный процесс, протекающий в пораженных тканях при воздействии на них иммунных комплексов [3, 7, 12]. Сходные процессы наблюдаются при острых воспалениях, локализованных в поврежденных тканях, например, при реактивном артрите (РЕА) [12–14]. Основными компонентами воспалительной реакции являются взаимоотношения между провоспалительными цитокинами, реактантами острой фазы воспаления, апоптозом и системой «протеолиз — антипротеолиз» [2, 4, 6, 10, 13]. Индуктором большей части воспалительных реакций выступает трансформирующий фактор роста-1 β (TGF), который активирует гены провоспалительных цитокинов — интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), интерлейкина-6 (ИЛ-6) и фактора некроза опухолей α (ФНО- α) [3, 4, 9, 12, 14]. Следует отметить, что эти цитокины находятся в антагонистических отношениях — ИЛ-1 β и ФНО- α при остром воспалении блокируют ген ИЛ-6 [4, 9, 13]. Блокада ИЛ-6 приводит к снижению биосинтеза белков, гены которых иницируются данным цитокином: альбумина и α 2-макроглобулина (МГ). Концентрации этих белков соответственно снижаются, что позволяет именовать их негативными реактантами острой фазы воспаления [4, 10, 15, 16]. Избыток ИЛ-1 β и ФНО- α приводит к активации зависимых от них генов позитивных реактантов острой фазы воспаления, например, α 1-антитрипсина (АТ) [4, 9, 10, 15]. Возникающий дефицит основного регулятора — МГ — инициирует развитие апоптоза и превращения интактных прогидролаз в активные ферменты [5, 7, 11]. Комплексное изучение вышеописанных реакций при коллагенозах и РЕА до настоящего времени не проводилось, что и послужило поводом для настоящего исследования.

Материал и методы

Исследована сыворотка крови 60 практически здоровых лиц, отобранных на основе диспансеризации (контрольная группа), 53 больных ревматоидным артритом (РА), 15 пациентов с РЕА и 16 больных системной красной волчанкой (СКВ). На основании клинических, рентгенологических и лабораторных критериев в группе больных с РА 1-я степень активности заболевания установлена у 16, 2-я — у 18 и 3-я — у 19 человек согласно общепринятой комплексной оценке активности воспаления [1]. У больных кровь брали на фоне обострения заболевания до лечения.

Концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа на основе наборов «ProCon» («Протеиновый контур — Тест», г. Санкт-Петербург) по инструкции изготовителя. Концентрации МГ, плазминогена (ПЛ) и АТ определяли низковольтным ракетным иммуноэлектрофорезом [10, 16]. Для определения содержания альбумина использовали его реакцию с бромкрезоловым зеленым и наборы фирмы «Spinreact» (Испания). Наборы этой же фирмы применяли для определения общего белка биуретовым методом и мочевиной кислоты уриказным методом. Использовали также калибраторы и контрольные материалы (норма, патология) фирмы «Spinreact». Для обработки данных иммуноферментного анализа использовали программу PC Microplate Manager (Bio-Rad, США). Биохимические и иммунохимические данные анализировали по программе Stat-Treck (Awareness, США). Оценка контроля качества полученных результатов проводилась в системе QC (Awareness, США). Параметры, приводимые в работе, имеют следующие обозначения: M — среднее, m — ошибка среднего, n — объем анализируемой выборки, p — достигнутый уровень значимости. При статистическом анализе проверка нормальности распределения признаков проводилась с использованием критерия Колмогорова—Смирнова, проверка гомогенности (однородности) дисперсии — с использованием критерия Левена. Парное межгрупповое сравнение показало

телей производилось по критерию Стьюдента. Критическое значение уровня значимости принималось равным 0,05. Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи пакета программ InStat 2.0 (Sigma, США) и SPSS 11.0 (SPSS Lab., США).

Результаты

Для всех изучаемых заболеваний характерна гипоальбуминемия (см. таблицу), которая наиболее выражена при СКВ. Однако лишь при РА 1-й степени активности и СКВ она сочетается со статистически значимым снижением концентрации общего белка. Для РА характерно Концентрации провоспалительных цитокинов и некоторых реактантов острой фазы воспаления при коллагенозах ($M \pm m$)

последующее увеличение уровня общего белка адекватно степени активности заболевания. Вышеуказанные показатели явно не связаны с состоянием системы «протеолиз — ингибитор», маркеры которой (ПЛ, МГ и АТ) не отличаются от величин контрольной группы, независимо от изучаемого заболевания или степени активности РА. Процессы апоптоза в поврежденных тканях лишь в случае СКВ проявляются увеличением концентрации мочевой кислоты.

Концентрация ИЛ-6 во всех случаях возрастает более чем в 10 раз, но не позволяет дифференцировать как заболевания, так и степень активности РА.

Показатель	Контрольная группа	Реактивный артрит	Ревматоидный артрит			Системная красная волчанка
			Степень тяжести			
			1-я	2-я	3-я	
ИЛ-1β, пг/мл	29,40 ± 2,80	143,80 ± 45,60* p = 0,0281	78,40 ± 47,10 p = 0,0288**	120,10 ± 38,90 p = 0,0290*, p = 0,0369**	327,00 ± 87,70 p = 0,0018*	89,00 ± 35,20 p = 0,0162**
ИЛ-6, пг/мл	4,70 ± 1,00	46,90 ± 9,70 p = 0,0002*	65,40 ± 28,50 p = 0,0148*	70,2 ± 11,3 p < 0,0001*	75,30 ± 20,30 p = 0,0006*	52,5 ± 12,7 p = 0,0004*
ФНО-α, пг/мл	43,90 ± 6,60	194,30 ± 65,00 p = 0,015**	78,60 ± 22,20 p = 0,0019**	106,0 ± 14,5 p = 0,0020*, p = 0,008**	522,60 ± 115,60 p = 0,0009*	75,3 ± 15,0 p = 0,0004**
МГ, г/л	1,96 ± 0,07	1,89 ± 0,24	1,86 ± 0,19	2,08 ± 0,17	2,07 ± 0,17	2,00 ± 0,14
АТ, г/л	2,08 ± 0,10	1,92 ± 0,29	2,31 ± 0,22	1,94 ± 0,11	2,560 ± 0,32	1,76 ± 0,18
ПЛ, мг/л	97,30 ± 8,00	106,30 ± 5,60	103,20 ± 14,30	92,80 ± 7,30	95,00 ± 4,70	91,80 ± 9,80
Альбумин, г/л	44,87 ± 0,38	41,15 ± 0,97 p = 0,0002*, p = 0,04***	41,00 ± 1,61 p = 0,0044*, p = 0,03***	39,69 ± 1,00 p < 0,0001*	40,42 ± 0,50 p < 0,0001*	36,86 ± 0,97 p < 0,0001*
Общий белок, г/л	73,00 ± 0,90	71,70 ± 1,50	65,80 ± 3,50 p = 0,0111*	70,00 ± 1,70	74,60 ± 2,30	67,90 ± 2,20 p = 0,0192*, p = 0,05**
Мочевая кислота, ммоль/л	221,20 ± 15,00	252,40 ± 22,00	251,90 ± 18,20	236,20 ± 17,30	252,40 ± 18,50	317,00 ± 26,80 p = 0,0245*

* Статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

** По сравнению с РА 3-й стадии.

*** По сравнению с СКВ.

В случае с ИЛ-1 β индивидуальные колебания концентраций столь высоки, что значимый прирост по отношению к нормальным значениям характерен для РЕА и РА 2—3-й степени активности, кроме того, при 3-й степени он достоверно отличается от показателей, характерных для СКВ. Нами отмечено, что рост концентраций ИЛ-1 β при РА сопровождается

усилением степени активности заболевания. Уровни ФНО- α также статистически значимо превышают норму только при РА 2—3-й степени активности за счет большой вариабельности результатов, отличия от СКВ и РЕА наблюдаются только при наиболее тяжелых формах РА (3-я степень), отличий СКВ от РЕА не обнаружено. Однако и в этом случае рост концентрации ФНО- α увели-

чивается согласно усилению степени активности РА.

Обсуждение

Синхронное увеличение концентраций провоспалительных цитокинов в кровотоке и пораженных тканях характерно как для коллагенозов, так и для РЕА [3, 6, 7, 13]. Ранее предполагалось, что это явление связано с дефицитом растворимых рецепторов циркулирующих цитокинов [3, 7]. Сегодня известно, что данная проблема не столь проста и связана с множественными нарушениями регуляторных процессов. При аутоиммунных заболеваниях характерны мутации генов, кодирующих биосинтез многих белков, включая МГ и провоспалительные цитокины [6, 12, 14]. Основным акцептором всех известных цитокинов является МГ, и нарушение его свойств вследствие генетических мутаций приводит к дискоординации гомеостаза [4, 5, 8, 9]. Наиболее важными последствиями замен аминокислот являются ограничение связывающей способности МГ по отношению к различным аффинантам, включая цитокины, а также резкое снижение способности доставлять связанные соединения в клетки-мишени [4, 9]. Сходные изменения функций МГ вызываются ионами гипохлорида, что наблюдается при коллагенозах и РЕА [15]. Недостаточный уровень активации системы протеолиза при коллагенозах создает дефицит комплексов МГ-гидролазы, которые необходимы для доставки цитокинов в клетки-мишени [4, 8]. В результате организм насыщается избытком TGF, который активирует биосинтез иных факторов роста, стимулирующих биосинтез различных цитокинов [5, 8]. Генетические мутации провоспалительных цитокинов

и МГ создают предпосылки срыва оппозитного влияния ИЛ-1 β и ФНО- α на ИЛ-6. При РЕА это явление можно объяснить повреждающим действием гипохлорида на МГ [4, 11, 15]. Увеличение же концентрации комплексов МГ-гидролазы путем перорального введения различных гидролаз нормализует концентрацию TGF и способствует затуханию воспалительных процессов при коллагенозах [4, 8].

В ходе исследования выявлено, что молекулярный баланс в системе «гидролаза — ингибитор» при коллагенозах и РЕА не изменяется. Помимо вышеперечисленных причин это можно связать с дефицитом факторов, способствующих превращению интактных прогидролаз в активные ферменты. Обычно инициатором этого процесса выступают гормоны, хемотактанты и гидролазы, поступающие в кровоток из поврежденных тканей. При изучаемых заболеваниях воспалительная реакция развивается в тканях, отделенных от системы кровообращения гистогематическими барьерами, которые, по-видимому, препятствуют поступлению в кровь активаторов гидролаз. Тем не менее проницаемость этих барьеров может возрастать, о чем свидетельствует наблюдаемая нами гипоальбуминемия, которая, скорее всего, вызвана не депрессией гена альбумина провоспалительными цитокинами, а расходом этого транспортного белка на удаление относительно низкомолекулярных продуктов некролиза. В пользу такой возможности свидетельствует увеличение концентрации мочевой кислоты при СКВ. При коллагенозах и РЕА гипоальбуминемия, вероятно, компенсируется увеличением концентраций иных белков, вследствие чего общая концентрация белка в сыворотке крови остается практически неизменной. При острых воспалениях гипоальбуминемия столь значительна, что прирост концентраций реактантов острой фазы воспаления не способен ее компенсировать [4, 10, 15]. Для РА характерна иная картина — при легких формах болезни гипоальбуминемия способна привести к снижению общей концентрации белка, тогда как с ростом тяжести заболевания слабо прогрессирующая гипоальбуминемия полностью компенсируется биосинтезом иных белков плазмы крови.

Заключение

Проведенное исследование позволило установить неспецифичность провоспалительных цитокинов, системы «гидролаза — ингибитор» и некоторых реактантов острой фазы воспаления для дифференциальной диагностики изучаемых заболеваний. Индивидуальные колебания концентрации двух из трех изученных цитокинов (ИЛ-1 β ,

ФНО- α) позволяют отдифференцировать РЕА и СКВ только от самых тяжелых стадий РА. Сывороточный уровень ИЛ-6 вообще не зависит от диагноза и степени тяжести заболевания. Целесообразным может быть только динамическое наблюдение за уровнями ИЛ-1 β и ФНО- α , повышение концентрации которых свидетельствует об усилении активности процесса при РА. Концентрации белков системы «протеиназа — ингибитор», а именно МГ, АТ и ПЛ, равно как и общая концентрация белка, также не могут служить диагностическим критерием. Концентрация альбумина может быть полезной только при дифференциальной диагностике СКВ легких форм РА на ранних стадиях развития заболевания. Лишь мочевая кислота относительно надежно позволяет идентифицировать СКВ, в патогенезе которой существенная роль принадлежит противоядерным антителам, запускающим расщепление нуклеиновых кислот, конечным катаболитом которых и является указанное соединение [8, 13].

Кроме того, данное исследование позволило установить наличие характерных отличий хронических воспалительных реакций при коллагенозах и локальной острой воспалительной реакции при РЕА от типичных характеристик острых воспалительных процессов. Отмечается высокий характер сходства изменений концентраций изучаемых белков при локальных воспалительных процессах, что обусловлено, скорее всего, особенностями проницаемости гистогематических барьеров, отделяющих очаг воспалительной реакции от системы кровообращения. В большинстве случаев наиболее демонстративные изменения характерны для РА, особенно при тяжелых формах этого заболевания. Это можно связать как с большей проницаемостью гистогематических барьеров при РА, так и с наличием при этом заболевании существенных нарушений регуляторных процессов, обусловленных генетическими мутациями.

Литература

1. *Ревматические болезни* / Под ред. В.А. Насонова, Н.В. Бунчук. М: Медицина, 1997.
2. Baier A., Meineckel I., Gay S., Pap T. Apoptosis in rheumatoid arthritis // *Curr. Opin. Rheumatol.* 2003. V. 1. \times 3. P. 274—279.
3. Bingham C.O. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation // *J. Rheumatol. Suppl.* 2002. V. 65. P. 3—9.
4. Birkenmeier G. Targetting the proteinase inhibitor and immune modulatory function of human alpha 2-macroglobulin // *Mod. Asp. Immunobiol.* 2001. V. 2. P. 32—36.
5. Cheon H., Yu S.J., Yoo D.H. et al. Increased expression of proinflammatory cytokines and metalloproteinase-1 by TGF-beta1 in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis and normal individuals // *Clin. Exp. Immunol.* 2002. V. 127. \times 3. P. 547—552.
6. Cvetkovic J.T., Wallberg-Jonsson S., Stegmayr B. et al. Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphism of the TNF-alpha, IL-1beta, and IL-1Ra genes // *J. Rheumatol.* 2002. V. 29. \times 2. P. 212—219.
7. Dayer J.M. The saga of the discovery of IL-1 and TNF and their specific inhibitors in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis // *Joint Bone Spine.* 2002. V. 69. \times 2. P. 123—132.
8. Desser L., Holomanova D., Zavadova E. et al. Oral therapy with proteolytic enzymes decrease excessive TGF-beta levels in human blood // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2001. V. 47(Suppl. 1). P. 10—15.
9. Goulin-Charnet A., Laune D., Granier C., Mani J.C., Pau B., Mourad G., Argiles A. Alpha 2-macroglobulin, the main serum antiprotease, binds beta 2-microglobulin, the light chain of the class I major histocompatibility complex, which is involved in human disease // *J. Clin. Sci. (Lond.)* 2000. V. 98. P. 427—433.
10. Maltseva N.V., Zorin N.A. The comparison of immunoregulatory properties of alpha 2-macroglobulin and pregnancy-associated alpha 2-glycoprotein // *Rus. J. Immunol.* 1997. V. 2. \times 2. P. 97—102.
11. Moore A.R., Appelboom A., Kawabata K. et al. Destruction of articular cartilage by alpha 2-macroglobulin-elastase complexes: role in rheumatoid arthritis // *Ann. Rheum. Dis.* 1999. V. 58. \times 2. P. 109—113.
12. Pantisalaia I., Trofimov S., Kobylansky E., Livshits G. Genetic and environmental influences on IL-6 and TNF-alpha plasma levels in apparently healthy general population // *Cytokine.* 2002. V. 19. \times 3. P. 138—146.
13. Scuderi F., Convertino R., Molino N. et al. Effect of pro-inflammatory/anti-inflammatory agents on cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus // *Autoimmunity.* 2003. V. 36. \times 2. P. 71—77.
14. Straub R.H., Paimela L., Peltomaa R. et al. Inadequately low serum levels of steroid hormones in relation to interleukin-6 and tumor necrosis factor in untreated patients with early rheumatoid arthritis and reactive arthritis // *Arthritis Rheum.* 2002. V. 46. \times 3. P. 654—662.
15. Wu S.M., Pizzo S.V. Mechanism of hypochlorite-mediated inactivation of proteinase inhibition by alpha 2-macroglobulin // *Biochemistry.* 1999. V. 38. \times 42. P. 13983—13990.
16. Zorina V.N., Levchenko V.G., Zorina R.M. et al. Pregnancy-associated plasma protein A, alpha 2-macroglobulin, pregnancy zone protein and their com-

Трофименко Н.А., Зорина В.Н., Архипова С.В. и др. Особенности воспалительной реакции при коллагенозах

plexes with IgG in sera of healthy nonpregnant and pregnant woman, and patients with breast cancer //

Russian J. Immunol. 2001. V. 6. к 1. P. 71—76.

Поступила в редакцию 11.05.2004 г.